Münster i/W. 1934. No III Med Diss.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität / Münster / Westfalen
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. H. Freund

Die Wirkung von Leberpräparaten auf die osmotische und Saponinresistenz der Erythrocyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.)

vorgelegt von
Marta Kaltenbach
(Zahnärztin)
aus Düsseldorf

1933
Gedruckt in der Buchdruckerei Franz Grube, Werne a. d. Lippe

Dekan: Prof. Dr. von Szily

Referent: Prof. Dr. K. Zipf

Korreferent: Prof. Dr. H. Freund

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.)

Meinen guten Eltern
gewidmet.

Die Wirkung von Leberpräparaten auf die osmotische und Saponinresistenz der Erythrocyten.

Die Entdeckung der antianaemischen Wirkung der Leber durch Minot und Murphy[1]) hat die Forschung nach dem Wesen der perniziösen Anaemie erneut in Fluß gebracht. Vorläufig ist zwar die Lösung des Problems noch nicht gelungen, dagegen sind neue Fragen aufgetaucht. Immer noch stehen sich zwei extreme Ansichten gegenüber, welche beide die Bildung eines Toxins als Krankheitsursache ansehen. Die eine sieht die Ursache der perniziösen Anaemie in einer toxischen Schädigung des Blutbildungsapparates, die andere in einer in Blutbahn und Milz vorsichgehenden Blutvergiftung mit ihren Folgen. Die Auffindung der antianaemischen Wirkungen der Lebersubstanz hat diesen beiden Theorien eine dritte Substitutionstheorie zugefügt. Danach soll in der Leber ein Stoff gebildet oder nach Resorption aus dem Magen daselbst deponiert werden, der für den Aufbau normal funktionstüchtiger Erythrocyten unbedingt notwendig ist. Bei der perniziösen Anaemie soll dieser Stoff, den man als Aminosäureverbindung mit den Bausteinen γ — Oxyprolin und β – Oxyglutaminsäure erkannt haben wollte, fehlen, aber durch perorale und parenterale Leberbehandlung ersetzbar sein. Die Substitutionstheorie hat sich aus hier nicht näher zu erörternden Gründen für die Erklärung der therapeutischen Erfolge mit Leber bei perniziöser Anaemie als nicht hinreichend erwiesen. Man ist deshalb auf die alten Theorien zurückgekommen und hat sie z. T. mit der Substitutionstheorie verknüpft.[2]) Jede

---

[1]) Minot u. Murphy, W. P., Journ. of americ. medical assoc. 1926, Bd. 87, S. 470; Boston med. and surgical Journ. 1926, Bd. 195, S. 410 — Journ. of Americ. med. assoc. 1927, Bd. 89, S. 759; Brit. med. Journ. 1927, S. 3484 — Journ. of biol. Chem. 1927, Bd. 74, S. 69 — British med. journ. 1927, S. 603.

[2]) R. Seyderhelm, Die Lebertherapie der perniziösen Anaemie, Spezielle Pathologie und Therapie innerer Krankheiten von Th. Brugsch, III. Erg. Bd. Urban u. Schwarzenberg, Berlin und Wien 1929 — Daselbst auch ausführliches Literaturverzeichnis.

befriedigende Theorie muß selbstverständlich eine Erklärung geben für den bei der perniziösen Anaemie gesteigerten Blutzerfall. Sowohl für den physiologischen, wie für den pathologisch gesteigerten Blutzerfall hat man die Tätigkeit des reticulo-endothelialen Apparates in Milz und Leber verantwortlich gemacht. An dieser Stelle hat man auch das mutmaßliche, anaemisierende Toxin und die antianaemische Substanz angreifen lassen. Eine Reihe von Beobachtungen sprechen tatsächlich dafür (Seyderhelm und Opitz[3]), Jungmann[4]), Schulten[5]), Schottmüller[6]), Conti[7]), daß die Lebertherapie am reticulo-endothelialen System angreift. Auch die Beeinflussung der Immunitätsvorgänge durch Leberextrakte (Fello[8]) und Milzextrakte (Schliephake[9]) weist in die gleiche Richtung.

Bei einem toxogenen Blutzerfall in der Blutbahn und Milz wäre der Angriffspunkt der Lebertherapie im Blute selbst zu suchen. In vitro ist eine antihaemolytische Wirkung von Leberextrakt gegen das Haemolysin des Bac. refringens, Bac. coli, Staphylococcen und Vibrio septic. festgestellt. Im lebenden Organismus war die Wirkung allerdings nicht so deutlich.[10]) Eine direkte Wirkung des antianaemischen Leberstoffes auf die Erythrocyten im Sinne einer Resistenzsteigerung ist bisher wenig erörtert worden. Reagenzglasversuche haben keine Beeinflussung der osmotischen Resistenz durch Leberextrakte ergeben. Außerdem sprechen die Befunde bei perniziöser Anaemie scheinbar gegen die Bedeutung einer Resistenzänderung. Denn in der Mehrzahl der Fälle von perniziöser und Botriocephalus-Anaemie ist die minimale osmotische Resistenz erhöht gefunden worden. Dieses, als Pachydermie bezeichnete, Symptom ist jedoch in keiner Weise charakteristisch und konstant. Es kommt auch Herabsetzung der osmotischen Resistenz vor. Der Widerspruch ist dazu nur ein scheinbarer. Denn die zur Feststellung von normaler und veränderter Resistenz benutzten Blutzellen

---

[3]) R. Seyderhelm u. G. Opitz, Klin. Wo. 1928, S. 205.

[4]) P. Jungmann, ebenda, 1928, S. 441.

[5]) H. Schulten, Münch. med. Wo. 1928, S. 633.

[6]) A. Schottmüller, Münch. med. Wo. 1927, S. 38.

[7]) F. R. Conti, Rass. Ter. e Pat. cli. 1930, Bd. 2, S. 473, ref. in Berichte f. d. ges. Physiol. 1931, Bd. 58, S. 506.

[8]) Fello, zit. bei K. Zipf, pharmakologische Grundlagen der Lebertherapie in A. Fraenkel, Der Weg zur rationellen Therapie, G. Thieme, Leipzig, 1933, S. 160.

[9]) Schliephake, E. u. G. Sincke, Klin. Wschr. 1931, S. 346.

[10]) M. Weinberg u. J. Alexa, C. rend. Soc. Biol. 1928, Bd. 99, S. 567, ref. in Berichte f. d. ges. Physiol. 1929, Bd. 48, S. 294.

sind nicht miteinander vergleichbar. In der Norm handelt es sich um normal große, ausgereifte, vollwertige Erythrocyten. Im Vollstadium der perniziösen Anaemie sind diese einzig vergleichbaren normalen, wenn auch toxisch geschädigten Zellen fast vollkommen verschwunden und durch unreife und anderweitig veränderte Zellen ersetzt. Die erhöhte Resistenz wird als Abwehrreaktion gewertet. Durch direkte Toxinwirkungen auf die zirkulierenden Erythrocyten soll eine Art Gerbung der Oberfläche stattfinden, die der toxischen Haemolyse entgegenwirkt. [11]) Auf eine ähnliche Wirkung wird beispielsweise die Resistenzsteigerung bei Phenylhydrazinwirkung zurückgeführt. [12]) [13]) [14]) Das Fehlen des vergleichbaren Substrats und die Interferenz mit kompensatorischen Vorgängen zeigt, daß die Resistenzbestimmungen bei perniziöser Anaemie zu falschen Folgerungen führen können. Dagegen sprechen die therapeutischen Erfolge der Lebertherapie eher dafür, daß die Resistenz der ausgereiften Erythrocyten bei perniziöser Anaemie herabgesetzt ist. Denn trotz Fortbestand der Krankheitsnoxe reifen unter der Leberwirkung die Erythrocyten wieder aus, verfallen also nicht mehr so stark der Haemolyse. Jedenfalls läßt sich die Frage, ob die Resistenz der Erythrocyten durch Leberextrakte verändert wird, nicht am perniziös anaemischen Blut entscheiden.

Es wurde deshalb untersucht, wie sich die Erythrocytenresistenz des gesunden Tieres unter der Einwirkung von Leberextrakten verhält.

I. Methodik.

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Kaninchen, die mit dem üblichen Wintermischfutter ernährt und gesondert gehalten wurden. Bestimmt wurden minimale und maximale osmotische Resistenz und die Resistenz gegen Saponin. Das Blut wurde aus einer gut blutenden Ohrrandvene durch Eintropfenlassen in physiologische Kochsalzlösung entnommen, die Aufschwemmung mit Glasperlen leicht geschüttelt und durch Colie-

[11]) Th. Brugsch u. A. Pappenheim, Die Anaemien, in Fr. Kraus u. Th. Brugsch, Spez. Pahtol. u. Therap. innere Krankheiten, Bd. 8, S. 717, Urban u. Schwarzenberg, Berlin u. Wien 1920.

[12]) v. Morawitz u. W. Pratt, Münch. med. Wo. 1908, Nr. 35.

[13]) Itami u. Pratt, Biochem. Z. Bd. 18, S. 303, 1909.

[14]) Rosenthal, Folia haematologica, Bd. 10, S. 253, 1910.

ren vom Fibrin befreit. Die defibrinierte Blut-Kochsalz-Suspension wurde nunmehr bei geringer Tourenzahl zentrifugiert. Die Blutkörperchen wurden durch Absaugen von der überstehenden Flüssigkeit getrennt, zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und jeweils wieder zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde mit physiologischer Kochsalzlösung eine 10%ige Blutkörperchenaufschwemmung hergestellt, die für den eigentlichen Haemolyseversuch verwendet wurde.

Die Prüfung auf osmotische Resistenz geschah auf die Weise, daß spitze Zentrifugengläschen mit je zwei ccm Kochsalzlösung in aufsteigender Konzentration beschickt wurden. Die Kochsalzkonzentrationen zweier aufeinander folgender Röhrchen unterschieden sich voneinander um 0,02 %. Zu jedem Röhrchen wurden 5 Tropfen der 10%igen Blutkörperchenaufschwemmung zugefügt. Nach zweistündigem Stehen wurde zentrifugiert und die maximale und minimale osmotische Resistenz bestimmt. Als maximale osmotische Resistenz wurde diejenige Salzkonzentration bezeichnet, bei der im Sediment die letzte Spur eines roten Niederschlages makroskopisch sichtbar war. Die Beurteilung der minimalen Resistenz geschah ebenfalls makroskopisch.

Die Bestimmung der Saponinresistenz geschah in ähnlicher Anordnung. Statt der aufsteigenden Kochsalzlösungen wurden aufsteigende Konzentrationen von Saponin in 0,85%iger Kochsalzlösung verwendet. Das Saponinpräparat war Sapon. alb. pur. Merck. Zu je zwei ccm Saponinkochsalzlösung wurden 5 Tropfen einer 10%igen Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung zugefügt und nach zwei Stunden wie oben beschrieben die maximale und minimale Resistenzgrenze makroskopisch abgelesen.

Die Tierversuche selbst waren so angeordnet, daß nach Feststellung der normalen osmotischen und Saponinresistenz das Versuchstier verschieden lange Zeit (10—14 Tage) mit Leberextrakten behandelt wurde. Am Ende der Versuchsperiode wurde erneut Blut entnommen und wiederum die Resistenz bestimmt. Von den Leberextrakten wurden täglich zwei ccm subcutan injiziert. Verwendet wurden folgende Injektionspräparate: Campolon, Hepatrat, Hepatopson und Heprakton.

II. Experimenteller Teil.

1. Die Wirkung von Leberextrakten auf die osmotische Resistenz.

Die osmotische Resistenz des Kaninchenblutes ist, wie von anderer Seite schon festgestellt wurde, kein absoluter Wert. Minimale und maximale Resistenz unterliegen normaler Weise gewissen individuellen Schwankungen. Nach neueren Untersuchungen von Kaulbersz[15]) liegt die minimale Resistenz beim Kaninchen zwischen 0,52—0,50 % NaCl. Unter 9 eigenen Versuchen war die minimale Resistenz 6 mal bei 0,52, einmal bei 0,50, einmal bei 0,54 und einmal bei 0,46 % NaCl. Die normale maximale osmotische Resistenz der Kaninchenerythrocyten wird mit 0,32—0,26 % NaCl. angegeben. Die von uns gefundenen Werte haben dieselbe Größenordnung und entsprechen 0,28 — 0,38 % NaCl. Maximale und minimale Resistenz blieben beim gleichen, unbehandelten Versuchstier während der einer Versuchsperiode entsprechenden Zeit konstant. Unter der Einwirkung von parenteral zugeführten Leberpräparaten stieg die maximale osmotische Resistenz regelmäßig an (siehe Tabelle I). Die höchste Resistenzsteigerung wurde bei einem 19 Tage mit Hepatrat behandelten Kaninchen festgestellt. Sie stieg von 0,36 % auf 0,26 % NaCl. Der niedrigste Anstieg der maximalen osmotischen Resistenz betrug 0,04 % (von 0,30 auf 0,26 bzw. von 0,34 auf 0,30 % NaCl). Die minimale osmotische Resistenz stieg nicht so stark, aber ebenfalls fast regelmäßig an. Nur in einem Falle blieb die minimale Resistenz unverändert. Der stärkste Anstieg betrug 0,06 % NaCl. (siehe Tabelle I).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die osmotische Resistenz der Erythrocyten durch Leberextraktbehandlung vermehrt wird.

---

[15]) J. Kaulbersz, Zschr. exp. Med. 1933, Bd. 86, S. 785.

Tabelle I.

Wirkung von Leberextrakten auf die osmotische Resistenz der Kaninchenerythrocyten.

Vor der Behandlung		Art des Leberextraktes	Behandlungsdauer in Tagen	Nach der Behandlung	
Maximale Resistenz bei % NaCl	Minimale Resistenz bei % NaCl			Maximale Resistenz bei % NaCl	Minimale Resistenz bei % NaCl
0,36	0,50	Hepatrat	19	0,26	0,50
0,38	0,54	Hepatrat	13	0,32	0,48
0,30	0,46	Campolon	13	0,26	0,40
0,36	0,52	Campolon	13	0,32	0,50
0,32	0,52	Hepatopson	9	0,26	0,50
0,34	0,52	Hepatopson	13	0,28	0,50
0,36	0,52	Heprakton	12	0,30	0,50
0,34	0,52	Heprakton	13	0,30	0,48
0,28	0,52	keine Behandlung	14	0,28	0,52

2. Wirkung von Leberextrakten auf die Saponinresistenz.

Die Resistenz gegen Saponin ist nach Kaulbersz[16]) ähnlichen Schwankungen unterworfen wie die osmotische Resistenz. Die maximale Saponinresistenz des Kaninchens liegt bei einer Saponinkonzentration von 1:33333 bis 1:20000. In unseren Versuchen lag sie zwischen 1:10000 und 1:20000. Die minimale Resistenzgrenze gegen Saponin wurde nur in zwei Fällen berücksichtigt. Beidemale lag sie bei einer Konzentration von 1:40000.

[16]) Kaulbersz, J., Zschr. exp. Med. 1933, Bd. 86, S. 785.

Die Wirkung der Leberpräparate auf die Saponinresistenz ist nicht so gleichförmig wie bei der osmotischen Resistenz. Am stärksten resistenzsteigernd wirkten Hepatrat und Heprakton (siehe Tabelle II). Unwirksam waren die Präparate Campolon und Hepatopson. Campolon bewirkte eine leichte Erniedrigung der maximalen Saponinresistenz, die aber, wie der Kontrollversuch zeigte, auch ohne Leberbehandlung eintreten kann. Die minimale Resistenz gegen Saponin wurde in keinem Fall verändert.

Als Ergebnis kann demnach festgestellt werden: Hepatrat und Heprakton steigern die maximale Resistenz gegen Saponin. Campolon und Hepatopson sind unwirksam.

Tabelle II.

Wirkung von Leberextrakten auf die Saponinresistenz der Kaninchenerythrocyten.

Vor der Behandlung Maximale Resistenz bei $^0/_0$ Saponin	Art des Leberextraktes	Behandlungsdauer in Tagen	Nach der Behandlung Maximale Resistenz bei $^0/_0$ Saponin
1 : 20000	Hepatrat	19	1 : 15000
1 : 19000	Hepatrat	13	1 : 12000
1 : 10000	Campolon	13	1 : 12000
1 : 13000	Campolon	13	1 : 14000
1 : 15000	Hepatopson	9	1 : 15000
1 : 11000	Hepatopson	13	1 : 11000
1 : 13000	Heprakton	12	1 : 11000
1 : 18000	Heprakton	13	1 : 9000
1 : 10000	keine Behandlung	14	1 : 12000

III. Besprechung der Ergebnisse.

Die eindeutige Zunahme der osmotischen Resistenz läßt den Schluß zu, daß diese Wirkung dem antianaemischen Stoff zukommt. Gegenüber dem therapeutischen Erfolg der Leberbehandlung besteht unter Berücksichtigung der oben erwähnten besonderen Bedingungen kein Widerspruch. Für die Beurteilung der Resistenzerhöhung ist von besonderer Wichtigkeit die Veränderung des normalen Blutbildes durch Leberbehandlung. Sie bewirkt bei mehrtägiger Zufuhr eine vorübergehende Anaemie mit Reticulocytose und nachfolgendem überkompensatorischem Anstieg von Haemoglobin und Erythrocytenzahl (Büttner,[17]) Adlersberg und Gottsegen).[18]) Da jüngere Blutkörperchen eine höhere Resistenz besitzen, so hängt die Resistenzsteigerung mit ihrem vermehrten Auftreten nach Leberbehandlung (Reticulocytose) sicher zusammen. Da im Gegensatz zur perniziösen Anaemie die Anzahl neuauftretender junger Erythrocyten während der Leber-Behandlung nur wenige Prozent beträgt, und ihr Auftreten nur in die ersten Behandlungstage fällt, so können sie nicht die alleinige Ursache der Resistenzsteigerung sein. Viel wahrscheinlicher ist, daß die Resistenz normaler, ausgereifter Erythrocyten durch den antianaemischen Stoff verstärkt wird. Die Folge wäre eine längere Lebensdauer und Vermehrung der reifen Erythrocyten.

Die Wirkung der Leberextrakte auf das normale Blutbild des Kaninchens und auf die osmotische Resistenz hat eine große Aehnlichkeit mit den Blutveränderungen im Höhenklima.[19]) Die Reticulocytose, die Vermehrung der Erythrocyten und des Haemoglobingehaltes, sowie das Ansteigen der osmotischen Resistenz sind bei beiden zu finden. Für die Resistenzerhöhung im Höhenklima spielt beim Menschen die Vermehrung junger Erythrocyten keine wesentliche Rolle. Stärker ist ihr Anteil bei der Resistenzsteigerung des Kaninchens. Die Hauptursache der Re-

[17]) H. E. Büttner, Klin. Wo. 1932, S. 1218.
[18]) D. Adlersberg u. G. Gottsegen, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 1929, Bd. 142, S. 323.
[19]) I. Kaulbersz, Zschr. exp. Med. 1933, Bd. 86, S. 785.

sistenzverstärkung liegt aber wohl in Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der Erythrocyten. Dasselbe muß auch für die Resistenzsteigerung durch Leberextrakte angenommen werden. Welcher Art diese chemischen Verschiebungen sind — Veränderungen des Kationen- und Anionengehaltes, des Verhältnisses von Lecithin zu Cholesterin oder des Gehaltes an anderen Blutbestandteilen — läßt sich im Einzelnen noch nicht sagen. Die Erhöhung der Saponinresistenz durch Lebersubstanz legt den Gedanken nahe, daß das Cholesterin dabei eine Rolle spielt. Tatsächlich ist der Cholesteringehalt bei perniziöser Anaemie nach Gantenberg[20]) abnorm niedrig und steigt bei erfolgreicher Lebertherapie über die Norm an. Beim normalen Kaninchen, dessen Cholesterinspiegel im Serum sehr schwankt, konnte Gantenberg[21]) keine eindeutige Beeinflussung feststellen. Vielleicht liegt darin auch die Ursache der teilweisen Unwirksamkeit von Leberextrakten gegenüber der Saponinrestenz. Hier können nur neue Versuche Klarheit schaffen. Dabei wird es weniger auf die Bestimmung des Cholesterinspiegels im Serum als des Cholesteringehaltes der Erythrocyten selbst ankommen.

Die gleichgsinnige Beeinflussung der osmotischen Resistenz durch Leberextrakte ist vielleicht geeignet als Grundlage für ein Testverfahren zur Gehaltsbestimmung an antianaemisch wirksamer Substanz. Eine endgültige Entscheidung wird aber erst auf Grund eines größeren Versuchsmaterials möglich sein.

---

[20]) R. Gantenberg, zit. bei K. Zipf, Pharmakol. Grundlagen der Lebertherapie in A. Fraenkel, Der Weg zur rationellen Therapie, G. Thieme, Leipzig 1933, S. 160.

[21]) R. Gantenberg, Medizinisch-naturwissenschaftliche Gesellschaft Münster/Westf., medizinische Abteilung, Sitzung vom 20. II. 33.

Zusammenfassung.

1. Die maximale und minimale osmotische Resistenz des Kaninchenblutes wurde durch mehrtägige parenterale Behandlung mit Campolon, Hepatrat, Hepatopson und Heprakton gesteigert.

2. Die maximale Saponinresistenz des Kaninchenblutes wurde durch Vorbehandlung mit denselben Leberpräparaten z. T. gesteigert — Hepatrat, Heprakton — z. T. nicht beeinflußt — Campolon, Hepatopson.

Lebenslauf.

Ich wurde geboren am 20. Oktober 1909 zu Gemünd-Eifel. Vom 6. Lebensjahre ab besuchte ich das St. Anna-Lyzeum in Düsseldorf, bestand dort 1926 das Einjährige und 1929 das Abitur auf dem Reformrealgymnasium derselben Schule. Das 1. Semester verbrachte ich in Innsbruck, die beiden folgenden in Bonn, wo ich am Ende des 3. Semesters das zahnärztliche Physikum bestand. Während der klinischen Semester war ich in Bonn, Kiel und Münster. Hier bestand ich am 15. Dezember 1932 im 8. Semester das zahnärztliche Staatsexamen.